Aus dem Städt. Hygienischen Universitäts-Institut zu Frankfurt a.M
(DIREKTOR: PROFESSOR DR. KÜSTER)

Untersuchungen über die Wirkung des Zentrifugierens auf säurefeste Bakterien unter verschiedenen Bedingungen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu

FRANKFURT am Main

vorgelegt von

FRIEDRICH HARTLING
aus
Frankfurt am Main

Mai 1938

Vervielfältigung: A.Krause Frankfurt-M. An der Hauptwache 7-8 (Bürohaus Pariser Hof) Ruf 57910

Referent: Prof. Dr. KÜSTER
Korreferent. Prof. Dr. SCHEIDT
Dekan: Prof. Dr. SCHMIEDEN

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Frankfurt a.M.

Es bestehen verschiedene Methoden zum Nachweis säurefester Bakterien, vor allem der Tuberkel-Bazillen, aus dem Sputum oder Blut. Auch die Zentrifuge kommt dabei in Anwendung. Es war notwendig, einmal zu untersuchen, wie sich säurefeste Bakterien beim Zentrifugieren verhalten, wenn man sie vorher in verschiedenartige Medien gegeben hat. Auch sollte der Einfluss der Zentrifugierungsdauer auf den Verlauf einiger Versuche untersucht werden. Die verwendeten säurefesten Bakterien waren Trompetenbazillen, die Medien Aqua dest., physiologische Kochsalzlösung, Serumlösung und Natriumzitratblut.

Der Erfolg des Zentrifugierens beruht auf dem Vorhandensein von Sedimentationserscheinungen. Es beschleunigt diese Vorgänge, die ja auch in einer ruhenden Bakterienaufschwemmung eintreten würden. Eine Sedimentierung von Bakterien, gleichgültig, ob mit oder ohne von aussen kommende Impulse, setzt also ein Senkungsvermögen der Bakterien voraus und damit auch eine Senkungsgeschwindigkeit. Letztere ist abhängig von der Grösse und Dichte der Bakterien, sowie von der Dichte und Viskosität des Mediums, d.h. der Aufschwemmungsflüssigkeit, in dem der Senkungsvorgang sich abspielt. Die Sedimentierung erfolgt umso schneller,

1. je größer die Dichte der Bakterien im Vergleich zur Dichte des Mediums ist, und

2. je geringer die innere Reibung des Mediums ist.

Zuerst sollte das Sedimentieren an Trompetenbazillensuspensionen in Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration untersucht werden. Nachstehend ist ein allgemeiner Überblick über die Art der Versuchsdurchführung angegeben.

Vor allem waren, um Fehlerquellen möglichst einzuschränken, größere Bakterienmengen zur Herstellung der Suspensionen zu verwenden. Die vom Nährboden abgeschabte Bakterien-Masse wurde in

Aqua.dest. gegeben und zwecks feiner Verteilung in einem mit Glasperlen versehenen Gefäß 45 Minuten lang geschüttelt. Sodann erfolgte eine dreimalige Waschung mit Aqua.dest., um die Bakterien möglichst von ihnen anhaftenden Nährbodenrückständen zu befreien. Anschließend wurden die derart vorbehandelten Bakterien dem zum Versuch bestimmten Medium zugesetzt und in diesem 45 Minuten im Schüttelapparat fein suspendiert. Nach dem Einfüllen und Wiegen des Gemisches in Zentrifugengläser, deren Gewicht vorher bestimmt war, konnte zentrifugiert werden. Die durch das Zentrifugieren über dem Sediment stehende Flüssigkeit wurde in vorher gewogene Schälchen gegossen und diese, wie auch die Zentrifugenröhrchen, die nunmehr die Sedimente enthielten, einer Gewichtsbestimmung unterzogen. Nach dem Trocknen der Zentrifugenröhrchen und Überstandsschälchen im Exsikkator während 24 Stunden fand ein nochmaliges Wiegen zur Feststellung der Trockengewichte von Sedimenten und Überständen statt. Von den erzielten Werten mußten noch die Gewichtsanteile, die von den eingetrockneten Substanzen der Medien herrührten, in Abzug gebracht werden, um die Gewichte der Bakterienmengen isoliert zu erhalten.

Folgendes Beispiel soll zur Erläuterung angeführt werden:

Ein Zentrifugenröhrchen ist mit 9 ccm einer Bakterienaufschwemmung in Aqua dest. und 9 ccm einer 5%igen NaCl-Lösung beschickt worden. Nach Ablauf des Versuchs liegt das getrocknete Sediment und der getrocknete Überstand vor. Nun entspricht der vorhandene NaCl-Gehalt nicht mehr einer 5%igen, sondern, da auch die Flüssigkeitsmenge der Aufschwemmung zu berücksichtigen ist, einer 2,5%igen Lösung.

Die Gewichte der Bakterienmengen sind zu bestimmen, indem zweimal die gleiche Menge eines gemessenen Suspensionsteils in vorher gewogene Schälchen gegeben, 24 Stunden getrocknet und dann

wieder gewogen wird. Auf diese Weise läßt sich der zur Verdunstung gelangte Flüssigkeitsteil in Anrechnung bringen und das Gewicht der eingetrockneten Bakterienmengen erhalten. Das Mittel aus den Ergebnissen beider Untersuchungen dient dann als Ausgangspunkt zur Bestimmung des Gewichtes der eingetrockneten Bakterien des übrigen Suspensionsteils. Dieses Verfahren gilt nur für Bakterienaufschwemmungen in Aqua dest. Bei Suspensionen in anderen Medien muß das Gewicht der anfallenden Trockenbestandteile in Abzug gebracht werden.

A. Das Verhalten von Trompeten-Bazillen Suspensionen beim Zentrifugieren in Kochsalzlösungen.

I. Die Ausbeute an Trompeten-Bazillen von sechs Hohn-Nährboden-Röhrchen wird geschüttelt, viermal in Aqua dest. gewaschen, mit 30 ccm Aqua dest. zu einer Suspension zusammengegeben, die dann, um eine sehr feine Verteilung der Bakterien zu erhalten, 45 Minuten in dem Schüttel-Apparat geschüttelt wird.

Von dieser 30 ccm umfassenden Suspension werden verwandt:

a) 9 ccm als Zusatz zu 9 ccm einer 1%igen NaCl-Lösung. Dieses Gemisch wird in ein Zentrifugenröhrchen mit der Bezeichnung 1 gegeben, dessen Gewicht vorher bestimmt worden ist:

53, 7080 g.

b) 9 ccm als Zusatz zu 9 ccm einer 5%igen NaCl-Lösung. Auch diese Mischung wird in ein Zentrifugenröhrchen mit der Bezeichnung V gefüllt, das ebenfalls vorher gewogen worden ist:

48, 4052 g.

c) Zweimal 4,5 ccm zur Bestimmung des Trockengewichtes der in dem Versuch benutzten Bakterienmengen.

Zwei Schälchen (A und B) werden jedes mit der oben genannten Suspensionsmenge beschickt und 24 Stunden zum Trocknen in den Exsikkator gestellt. Anschließend wird wieder gewogen. Die Differenz der Werte beider Wiegungen ergibt das Gewicht der eingetrockneten Bakterien.

Gewicht der leeren Schale: A = 45,7226 g.

Gewicht der leeren Schale: B = 41,6590 g.

Wiegen nach dem Trocknen:

Schale A + eingetrocknete Bakterien:
45,7336 g. Differenz: 0,0110 g.

Schale B + eingetrocknete Bakterien:
41,6704 g. Differenz: 0,0114 g.

Der Mittelwert ist: 0,0112 g, d.h.:

in 4,5 ccm der vorliegenden Suspension sind durchschnittlich 0,0112 g Trompeten-Bazillen nach dem Trocknen enthalten. In den 18 ccm Suspension, mit denen die beiden Zentrifugenröhrchen beschickt wurden, müssen demnach 0,0448 g Trompeten-Bazillen enthalten sein.

Die Aufschwemmungen (a und b) werden 15 Minuten bei 4.000 Umdrehungen zentrifugiert, die Überstände in Schälchen abgegossen und diese, sowie die Zentrifugenröhrchen mit den Sedimenten, gewogen. Darauf erfolgt die 24stündige Trocknung im Exsikkator und ein letzmaliges Wiegen zur Ermittlung der Gewichte der getrockneten Sedimente und Überstände.

Gewicht der leeren Zentrifugenröhrchen:	Zentrifugenröhrchen + Sediment nach Abguß d. Überstandes :	Zentrifugenröhrchen + getrocknetes Sediment:
I = 53,7080 g	54,0100 g	53,7278 g
V = 48,4052	48,7380	48.4314
Gewicht der leeren Schalen für Überstände:	**Schalen + ungetrocknete Überstände:**	**Schalen + getrocknete Überstände:**
I = 20,0466	37,3242	20,1378
V = 19,5948	37,0300	20,0724

Nach Berücksichtigung des Kochsalzanteiles befinden sich im Sediment des Zentrifugenröhrchens

I = 0,0184 g Trompeten-Bazillen,

im Sediment des Zentrifugenröhrchens

V = 0,0185 g Trompeten-Bazillen, im Überstand von

I = 0,0053 g und im Überstand von

V = 0,0052 g Trompeten-Bazillen.

Die vier Werte zusammen ergeben:

0,0474 g Trompeten-Bazillen.

II. P a r a l l e l v e r s u c h zu I

Anordnung und Verlauf des Versuches sind die gleichen wie bei I.

Ausgangspunkt ist wieder die Ausbeute von 6 Hohn-Nährboden-Röhrchen mit Trompeten-Bazillen.

Bestimmung des Trockengewichtes der in 4,5 ccm Suspension enthaltenen Trompeten-Bazillen durch Eintrocknen dieser Mengen in den Schälchen A und B.

Gewicht der leeren Schälchen:

A = 42,2374 g
B = 45,7268 g.

Nach dem Trocknen:

Schälchen A + Bakterien:	42,2462	g
Differenz:	0,0088	g
Schälchen B + Bakterien:	45,7360	g
Differenz:	0,0092	g
Der Mittelwert beträgt:	0,0090	g.

Demnach sind in 4,5 ccm vorliegender Suspension durchschnittlich 0,0090 g Trompeten-Bazillen enthalten, in den 18 ccm, die zur Beschickung der Zentrifugenröhrchen verwendet werden, also ungefähr:

0,0360 g.

Zentrifugierungsdauer wieder 15 Minuten, Umdrehungsgeschwindigkeit 4 000, wie bei Versuch I, Aufenthalt im Exsikkator 24 Stunden. Kontrollwiegen ebenfalls wie unter I.

Zur Gewichtsbestimmung der Sedimente:

Gewicht der leeren Zentrifugenröhrchen	Zentrifugenröhrchen + Sediment nach Abguß des Überstandes:	Zentrifugenröhrchen + getrocknetes Sediment:
I = 44,6702 g	44,8646 g	44,6874 g
V = 50,0232	50,2800	50,0452
Gewicht der leeren Schalen für Überstände:	Schalen + ungetrocknete Überstände:	Schalen + getrocknete Überstände:
I = 19,6104 g	26,8892 g	19,6992 g
V = 16,4530	36,6100	16,9478

Nach Berücksichtigung des NaCl-Gehaltes befinden sich im Sediment des Zentrifugenröhrchens:

I = 0,0163 g Trompeten-Bazillen,

im Sediment des Zentrifugenröhrchens

V = 0,0161 g Trompeten-Bazillen,

im Überstand von

I = 0,0029 g und im Überstand

von V = 0,0033 g Trompeten-Bazillen.

Zusammen ergäbe das ein Gewicht von:

0,0386 g.

Die Ergebnisse beider Versuche lassen erkennen, daß ungefähr 80% der Bakterienmengen der als Ausgang dienenden Suspensionen sich im Sediment niederschlagen, wogegen der Rest im Überstand verbleibt. Außerdem ist zu ersehen, daß die Konzentrationsunterschiede zwischen 1 - und 5%iger NaCl-Lösung nicht in der Lage sind, einen nennenswerten Einfluß auf den Umfang der Sedimentation der Trompeten-Bazillen auszuüben. Denn obwohl die Dichte der 5%igen NaCl-Lösung 5 x größer ist, als die einer 1%igen, ist doch eine deutliche Verminderung der Gewichtsmenge der zur Sedimentation gelangenden Bakterien nicht festzustellen. Auch die Verschiedenheit der inneren Reibung wirkt sich nicht aus.

B. Das Verhalten von Trompeten-Bazillen-Suspensionen beim Zentrifugieren in Serumlösungen.

Die Ausbeute an Trompeten-Bazillen von acht Hohn-Nährboden-Röhrchen wird geschüttelt, dreimal gewaschen, mit 30 ccm phsiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und dann noch einmal in den Schüttelapparat gegeben.

Von dieser 30 ccm umfassenden Suspension werden verwendet:

a) 9 ccm als Zusatz zu 9 ccm einer 5%igen Serumlösung (95% physiologische Kochsalzlösung + 5% steriles Pferdeblutserum). Dieses Gemisch wird in ein Zentrifugenröhrchen mit der Bezeichnung V und dem Gewicht von :

48,2228 g gegeben.

b) 9 ccm als Zusatz zu 9 ccm einer 50%igen Serumlösung (50% physiologische Kochsalzlösung + 50% steriles Pferdeblutserum).
Auch diese Mischung wird in ein Zentrifugenröhrchen mit der Bezeichnung L und einem Gewicht von:

50,1774 g gefüllt.

c) Zweimal 4,5 ccm zur Bestimmung des Trockengewichtes der in dem Versuch benutzten Bakterienmengen.

In 9 ccm Suspension befinden sich an Trompeten-Bazillen:

0,0320 g.

Bei Feststellung des Gewichtes der zur Sedimentation gelangten Bakterien ist nunmehr neben dem NaCl aus der physiologischen Kochsalzlösung noch ein anderer Faktor zu berücksichtigen, nämlich die aus dem Serum restierende eingetrocknete Eiweissubstanz. Zu ihrer Erfassung dient folgender Versuch:
2 x 3 ccm Pferdeblutserum werden in die Schälchen

I = 24,6606 g
und II = 21,3038 g

gegeben und 24 Stunden im Exsikkator getrocknet, danach zweite Wiegung:

I = 24,9336 g
II = 21,5766 g

Differenz zwischen den Wiegungsergebnissen von

I = 0,2730 g
von II = 0,2728 g
Mittel = 0,2729 g.

In 3 ccm Serum sind also durchschnittlich nach dem Eintrocknen an getrockneter Substanz

0,2729 g vorhanden,

in 1 ccm Serum also:

0,0991 g.

Von letzterem Wert ausgehend, lassen sich alle in den Versuchen anfallenden Serumtrockensubstanzen entsprechend berücksichtigen.

Die Zentrifuge wird wiederum bei 4.000 Umdrehungen 15 Minuten lang beansprucht. Die Überstände werden dann in Schälchen abgegossen, deren Gewicht bestimmt ist, und diese, sowie die Zentrifugenröhrchen mit den Sedimenten einer 24-stündigen Trocknung unterzogen. Das folgende letzte Wiegen dient wieder zur Ermittlung der eingetrockneten Flüssigkeitsmengen.

Leere Zentrifugengläser:	Zentrifugengläser + Sediment nach Abguß des Überstandes:	Zentrifugengläser + getrocknetes Sediment:
V = 48,2228	48,5668	48,2470
L = 50,1774	50,5010	50,2048

Schalen für Überstände:	Schalen + ungetrock- Überstände:	Schalen + getrocknete Überstände:
V = 18,8946	36,0614	19,0890
L = 18,1665	35,5200	18,7036

Nach Abzug der Werte von Kochsalz und Serumtrockensubstanzen befinden sich an Trompeten-Bazillen im Sediment des Zentrifugenröhrchens:

V = 0,0207 g,

des Zentrifugenröhrchens:

L = 0,0182 g,

im Überstand von:

V = 0,0117 g

und von L = 0,0144 g.

Bei gleichbleibender Zentrifugierungsdauer von 15 Minuten und gleicher Umdrehungszahl von 4.000 ist die Sedimentation der Trompeten-Bazillen in den Serumlösungen bedeutend geringer als vergleichsweise in den Kochsalzlösungen. Bei letzteren betrug der Anteil der zur Sedimentation gelangten Bakterienmenge 80% der Gesamtmenge. In der 5%igen Serumlösung dagegen gehen nur ungefähr 64% in den Niederschlag, in der 50%igen noch weniger, etwa 56%. Also gelangen in der zuletzt angeführten Lösung 15% weniger Bakterien zur Sedimentation als in der ersteren. Die Erklärung dieses Ergebnisses ist in der wesentlich größeren Dichte und inneren Reibung der 50%igen Serumlösung zu suchen.

C. Der Einfluss der Zentrifugierungsdauer auf Trompeten-Bazillen-Suspensionen in verschiedenen Medien.

Weil Aqua dest. die einfachste Form eines Mediums darstellt, wurde die Untersuchung der Frage nach dem Einfluss der Zentrifugierungsdauer auf Trompeten-Bazillen-Suspensionen in Aqua dest. vorgenommen.

I. Die Ausbeute an Trompeten-Bazillen von sechs Hohn-Röhrchen wird geschüttelt, dreimal in Aqua dest. gewaschen, mit 55 ccm Aqua dest. zu einer Suspension zusammengegeben, die wiederum für 45

Minuten in den Schüttelapparat kommt. Von derselben werden wieder zweimal 4,5 ccm zur Bestimmung der in der Suspension enthaltenen Gewichtsmenge von Trompeten-Bazillen verwendet.

Gewicht der leeren Schälchen:

A = 22,1840 g
B = 18,8698 g

Nach dem Trocknen:

A = 22,1908 g
Differenz: 0,0068 g
B = 18,8764 g
Differenz: 0,0066 g

In 9 ccm Suspension sind also ungefähr
0,0134 g Trompeten-Bazillen.

Sechs Zentrifugenröhrchen von vorher bestimmtem Gewicht und den Bezeichnungen a,b,c,d,e,f werden mit je 9 ccm Suspension und 9 ccm Aqua dest. beschickt und verschieden lang zentrifugiert:

Zentrifugenglas

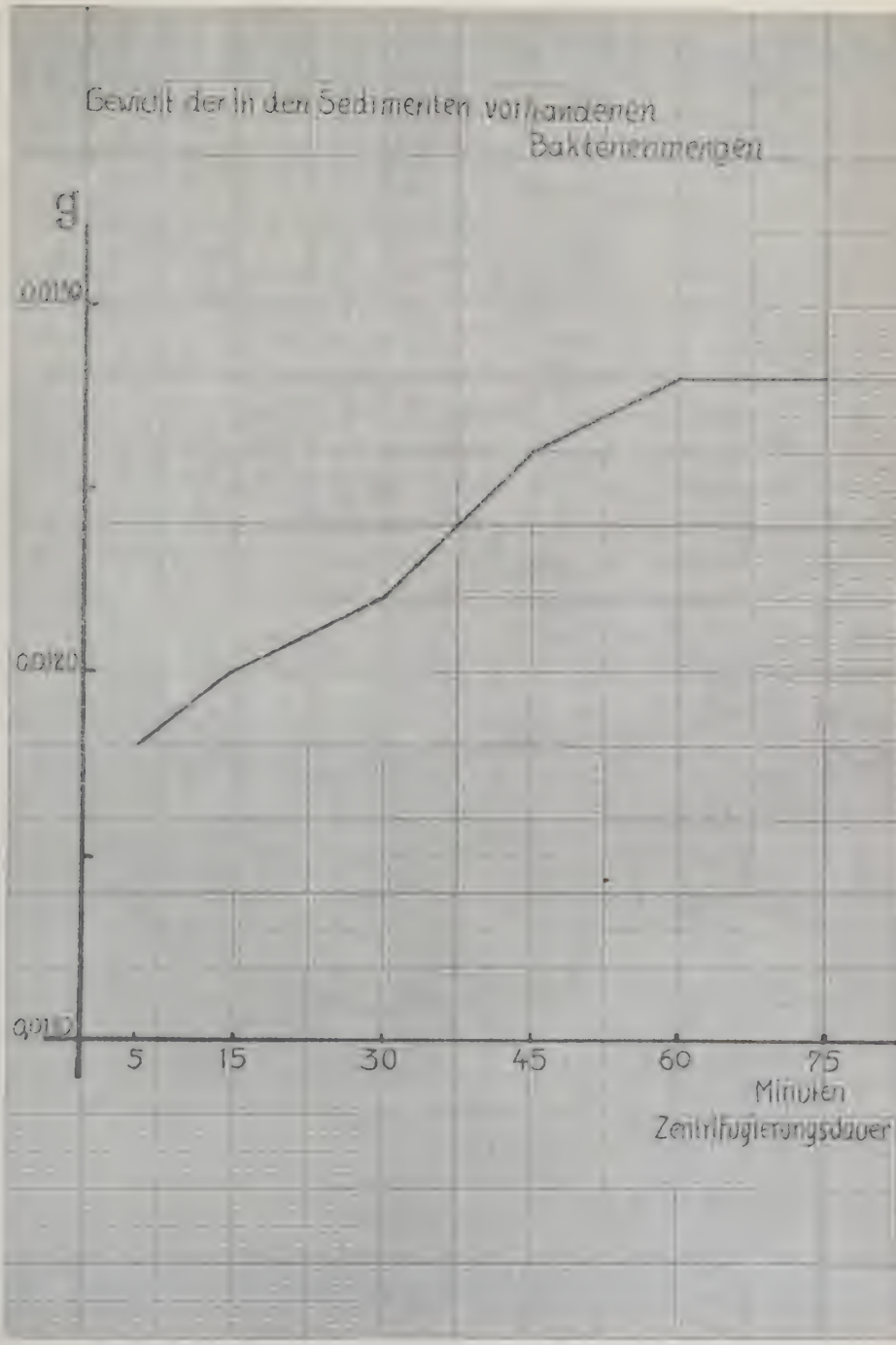
a = 5 Minuten
b = 15 "
c = 30 "
d = 45 "
e = 60 "
f = 75 "

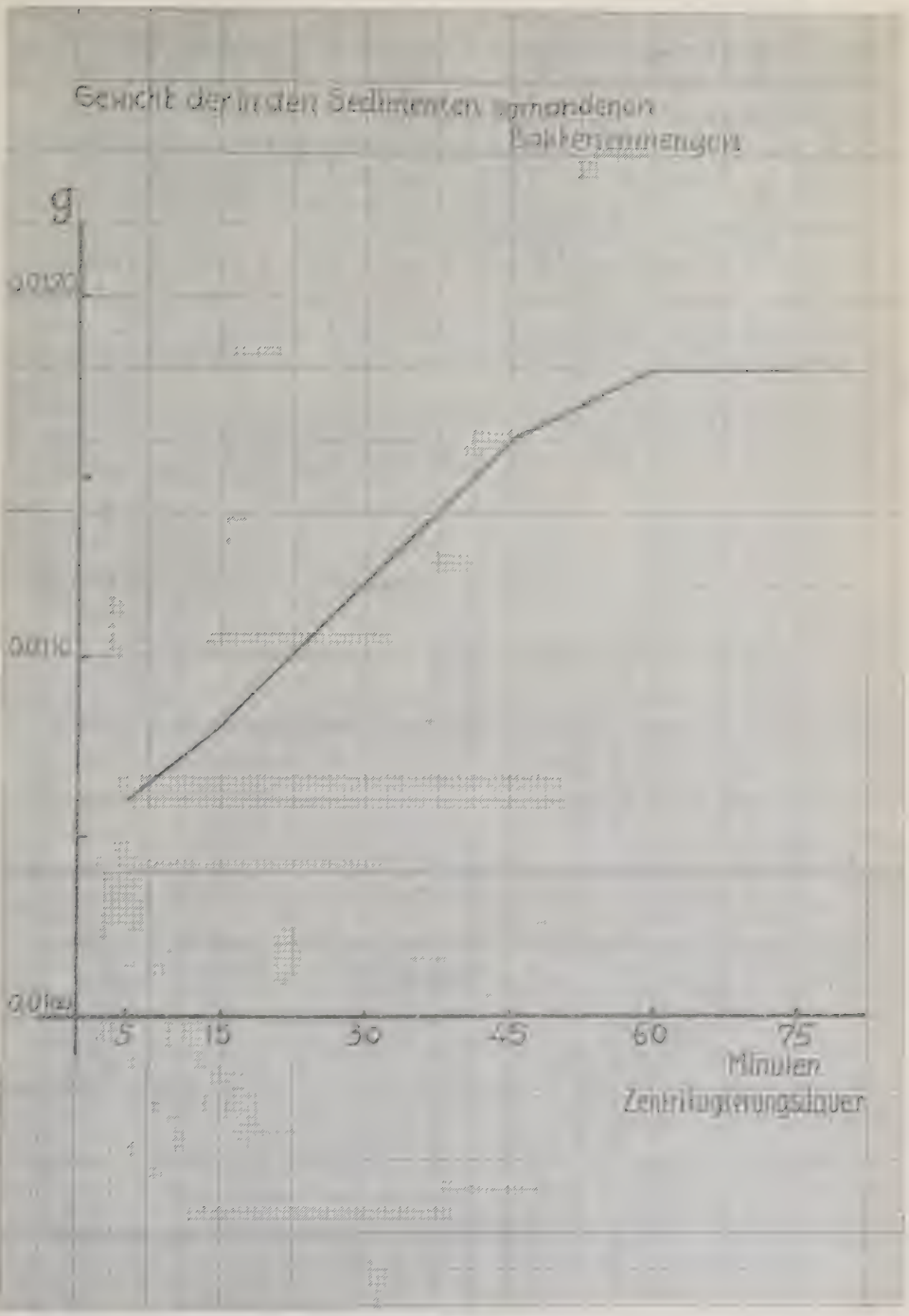
Die Zentrifugierungsgeschwindigkeit beträgt 4.000 Umdrehungen. Nach Ablauf der jeweiligen Zeit erfolgt Flüssigkeits-Austrocknung im Exsikkator um die Bakterienrückstände gewichtsmässig erfassen zu können. Das gilt sowohl für Sedimente und Überstände.

Zentrifugenröhrchen:	Zentrifugenröhrchen + Sediment:	Sediment:	Die im Sediment niedergeschlagene Bakterienmenge in % der Ausgangsmenge:
a = 50,1590	50,1708	0,0118	88,05 %
b = 48,2046	48,2126	0,0120	89,54 %
c = 43,5226	43,5348	0,0122	91,04 %
d = 50,3402	50,3528	0,0126	94,02 %
e = 49,2260	49,2388	0,0128	95,52 %
f = 45,5916	45,6044	0,0128	95,52 %

Schälchen für Überstand:	Schalen + Überstand:	Überstand:	Die im Überstand gebliebene Bakterienmenge in %:
a = 20,6626	20,6642	0,0016	11,94 %
b = 19,6742	19,6756	0,0014	10,44 %
c = 21,2990	21,3004	0,0014	10,44 %
d = 18,7218	18,7226	0,0008	5,97 %
e = 24,6598	24,6606	0,0008	5,97 %
f = 22,1840	22,1846	0,0006	4,47 %

(Kurve S. 14a)


Gewicht der in den Sedimenten vorhandenen Bakterienmengen
g
0,0150
0,0120
0,0100
5
15
30
45
60
75
Minuten
Zentrifugierungsdauer


Gewicht der in den Sedimenten vorhandenen Bakterienmengen
g
0,0120
0,0110
0,0100
5
15
30
45
60
75
Minuten
Zentrifugierungsdauer

II. P a r a l l e l v e r s u c h zu I.

Die Ausbeute an Trompeten-Bazillen von sechs Hohn-Röhrchen wird, wie oben schon angegeben, behandelt und mit 55 ccm Aqua dest. eine Suspension hergestellt. Wieder sechs Zentrifugenröhrchen a, b, c, d, e, f, werden mit je 9 ccm Suspension und 9 ccm Aqua dest. beschickt und verschieden lang:

5, 15, 20, 35, 60, 75 Minuten zentrifugiert bei 4.000 Umdrehungen. Gewichtskontrollen und Trocknung wie bei I.

In 9 ccm Suspension sind durchschnittlich 0,0122 g Trompeten-Bazillen enthalten.

Zentrifugenröhrchen:	Zentrifugenröhrchen + Sediment:	Sediment:	% der Sedimentbakterien im Vergleich zum Ausgangsbakterienwicht:
a = 47,8394	47,8500	0,0106	86,97 %
b = 53,7052	53,7160	0,0108	88,53 %
c = 49,3814	49,3926	0,0112	91,80 %
d = 46,6388	46,6504	0,0116	95,10 %
e = 47,6286	47,6404	0,0118	96,71 %
f = 48,4032	48,4150	0,0118	96,71 %

(Kurve S. 15a)

Die starke Sedimentation von Trompeten-Bazillen in Aqua dest. ist bei der geringen Dichte und inneren Reibung nicht weiter verwunderlich. Bemerkenswert aber erscheint der Einfluss der Zentrifugierungsdauer auf die Sedimentation. Zwischen den Zentrifugierungszeiten von 5 Minuten und 60 Minuten steigert sich die Menge der sedimentierten Bakterien um rund 9 %. Die Menge der niedergeschlagenen Bakterien wächst nicht gleichmäßig entsprechend gleicher Zeitabstände.

Die Steigerung der Sedimentation beim Zentrifugieren auf die Dauer von 60 Minuten ist schon nicht mehr sehr wesentlich und die 75-minütige Zentrifugierungszeit ist nicht mehr in der Lage, eine Veränderung des Sedimentes hervorzurufen.

III. Das Verhalten von Trompeten-Bazillen-Suspensionen in Serumlösungen beim Zentrifugieren.

a) Ausgangspunkt ist die Trompeten-Bazillen-Ausbeute von zehn Nährbodenröhrchen. Sie wird, wie schon öfters dargestellt, behandelt und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Es wird eine Suspension von 55 ccm hergestellt.

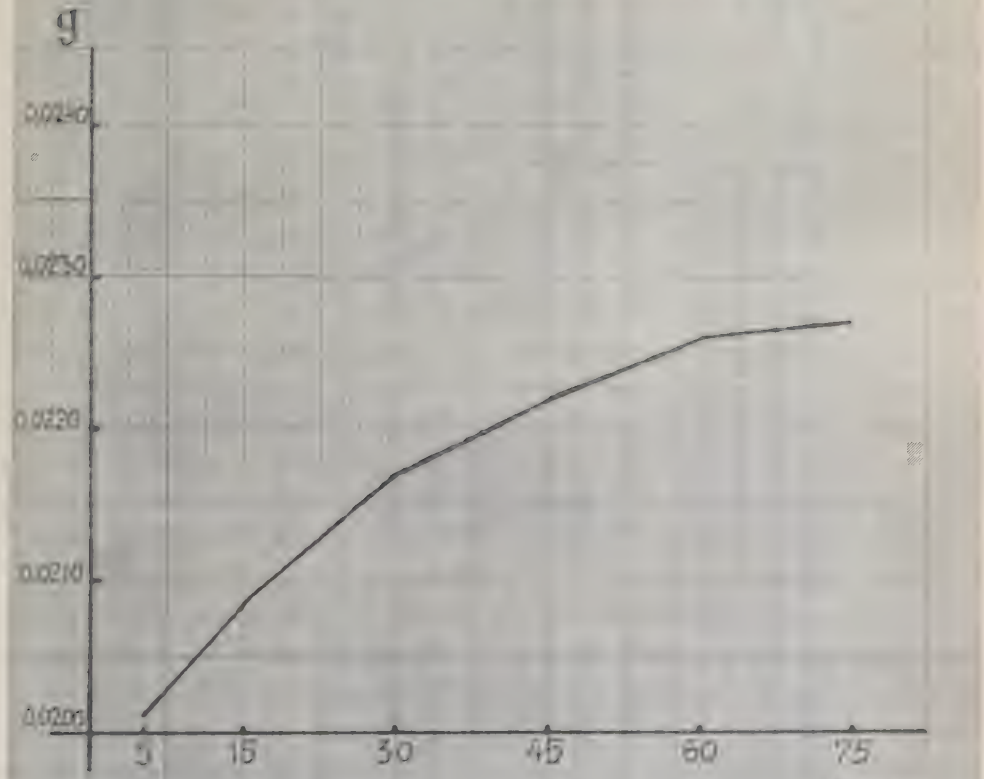
Die Untersuchung ergibt, daß in 9 ccm Suspension
0,0345 g Trockenbakterien enthalten sind.

Sechs Zentrifugenröhrchen, deren Gewicht bestimmt ist und die die Bezeichnung a, b, c, d, e, f führen, werden mit je 9 ccm Suspension und 9 ccm einer 15%igen Serumlösung (15 Teile steriles Pferdeblutserum auf 85 Teile physiologische Kochsalzlösung) beschickt und verschieden lang zentrifugiert.

a =	5 Minuten	d =	45 Minuten
b =	15 "	e =	60 "
c =	30 "	f =	75 " .

Die Zentrifugierungsgeschwindigkeit beträgt wieder 4.000 Umdrehungen in der Minute. Nach

Gewicht der in den Sedimenten vorhandenen Bakterienmengen



Nach Ablauf der jeweiligen Zeit wird der Überstand abgegossen und Zentrifugenglas mit Sediment gewogen. Nach einer 24-stündigen Trocknung erfolgt die letzte Gewichtskontrolle.

Zentrifugengläser:	Zentrifugengläser + ungetrocknetes Sediment:	Zentrifugengläser + getrocknetes Sediment:	Bakterien im Sediment:	% der Gesamtbakterienmenge:
a = 51,0784	51,3478	51,1023	0,0201	58,31 %
b = 49,3814	49,6888	49,4066	0,0208	60,28 %
c = 53,7052	53,9852	53,7308	0,0217	62,84 %
d = 46,8530	47,1508	46,8794	0,0222	64,24 %
e = 51,0286	51,3190	51,0554	0,0226	65,50 %
f = 47,8394	48,1266	47,8662	0,0228	66,08 %

(Kurve S.17a)

Im Vergleich zu den beiden vorangegangenen Versuchen mit Aqua dest.-Suspensionen zeigt der vorliegende im Ergebnis bestimmte Übereinstimmungen, aber auch gewisse Abweichungen. Die größte Steigerung der niedergeschlagenen Bakterienmengen liegt auch hier zwischen den Zentrifugierungszeiten von 30 und 45 Minuten. In den Versuchen mit Aqua dest.-Suspensionen betrug die Steigerung der Ausbeute von dem einen zum anderen Zeitpunkt: 4,5 %; im vorliegenden Versuch hingegen beläuft sie sich auf 2,4 %. Außerdem ist auch die Sedimentation im Gesamten nicht so stark. Bei der Serumlösung gelangen, als höchste Steigerung, nach 75-minütigem Zentrifugieren 66,08% der Gesamtbakterienmenge zur Sedimentation, bei Aqua dest. hingegen 96 %, ein Unterschied, der bei der unterschiedlichen Dichte beider Medien zu erwarten war.

b) Ausgangspunkt ist die Trompeten-Bazillen-Ausbeute von acht Hohn-Röhrchen, die nach den dargestellten Methoden gereinigt und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt wird. Die Suspension umfaßt 55 ccm.

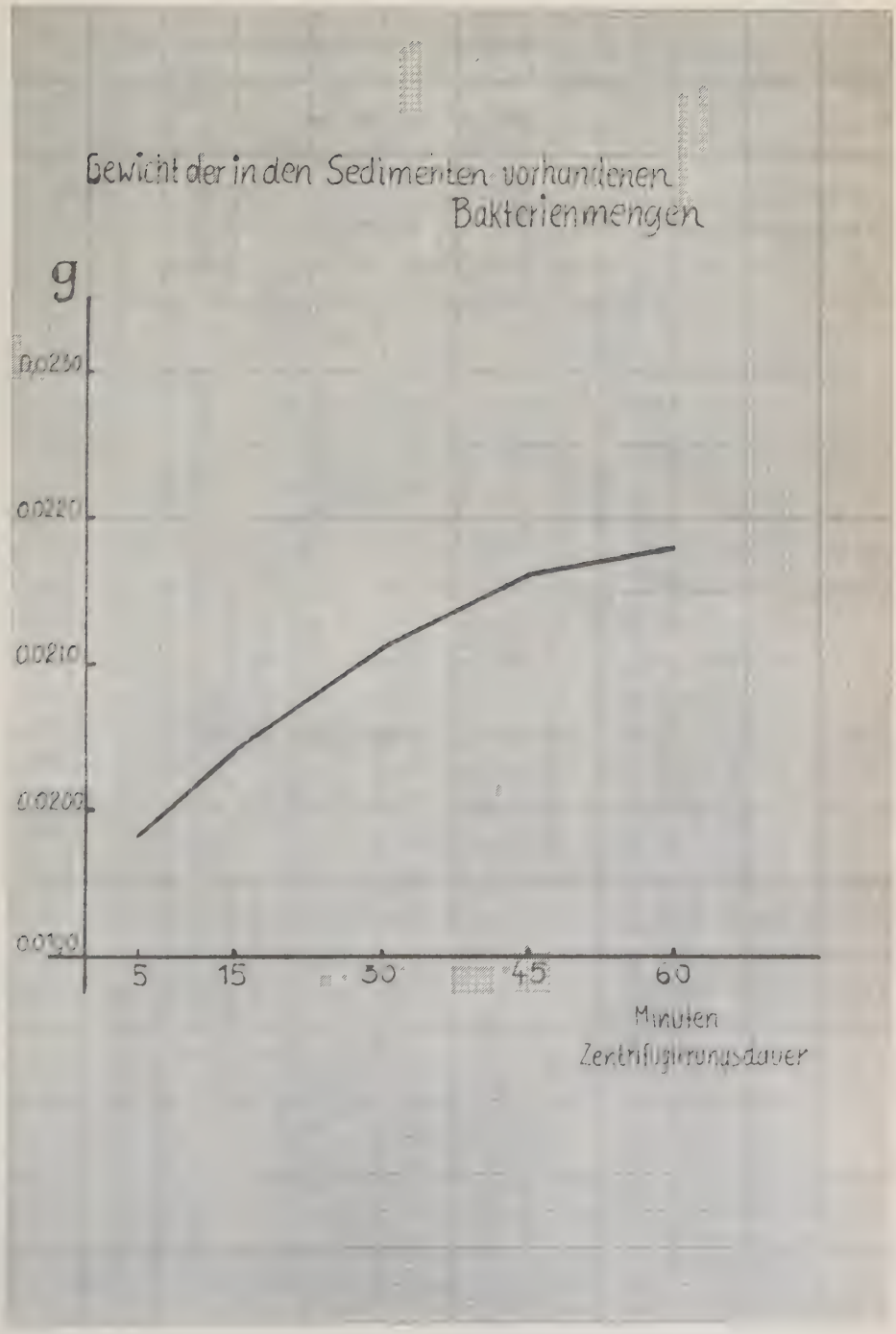
Die Untersuchung ergibt, daß in 9 ccm durchschnittlich:

0,[illegible]21 g Bakterien enthalten sind.

Sechs Zentrifugenröhrchen, deren Gewicht bekannt ist, und die die Bezeichnungen a, b, c, d, e, f führen, werden mit je 9 ccm Suspension und 9 ccm einer 5%igen Serumlösung (5Teile steriles Pferdeblutserum auf 95 Teile physiologische Kochsalzlösung) beschickt und verschieden lange zentrifugiert:

a = 5 Minuten
b = 15 "
c = 30 "
d = 45 "
e = 60 "
f = 75 "

Im Weiteren verläuft der Versuch wie unter IIIa.


Gewicht der in den Sedimenten vorhandenen Bakterienmengen
g
0,0230
0,0220
0,0210
0,0200
0,0190
5
15
30
45
60
Minuten
Zentrifugierungsdauer

E r g e b n i s :

Zentrifugengläser:	Zentrifugengläser + ungetrocknetes Sediment:	Zentrifugengläser + getrocknetes Sediment:	Bakterien im Sediment:	% der Gesamtbakterienmenge:
a = 44,3334	44,6338	44,3562	0,0198	61,68 %
b = 47,8286	48,1302	47,8520	0,0204	63,55 %
c = 46,6388	46,8922	46,6624	0,0211	65,73 %
d = 48,4032	48,6702	48,4274	0,0216	67,28 %
e = 49,2132	49,4722	49,2364	0,0218	67,90 %

Die Sedimentation hat eine Steigerung um ungefähr 3,5 % im Vergleich zu IIIa erfahren. Im Übrigen stellen die vorliegenden eine Bestätigung der obigen Ergebnisse dar.

(Kurve S. 19a)

D. Das Verhalten von Trompeten-Bazillen-Suspensionen im Blut beim Zentrifugieren.

I. Die Trompeten-Bazillen-Ausbeute von sechs Hohn-Röhrchen wird gewaschen, geschüttelt und mit Aqua dest. zu einer Suspension zusammengegeben.

Zweimal 5 ccm derselben werden zur Bestimmung des Gewichtes der in ihnen vorhandenen Bakterien in zwei Schälchen (mit den Bezeichnungen A und B) gegeben und 24 Stunden im Exsikkator getrocknet.

Gewicht der Schale: A = 16,0968 g,

" " " : B = 19,3874 g.

Nach dem Trocknen:

Schale A + eingetrocknete Bakterien:
16,1040 g. Differenz: 0,0072 g.

Schale B + eingetrocknete Bakterien:
19,3952 g. Differenz: 0,0078 g.

Das Mittel aus beiden Differenzwerten ist:
0,0075 g.

In 5 ccm vorliegender Suspension sind also rund: 0,0075 g Bakterien enthalten, in 1 ccm demnach:
0,0015 g.

Vier Zentrifugenröhrchen, deren Gewicht bekannt ist, und die die Bezeichnungen a, b, c, d, tragen, werden mit der erwähnten Suspension beschickt und zwar Zentrifugenröhrchen

a	mit	1	ccm
b	"	0,1	"
c	"	0,01	"
d	"	0,001	"

und mit je 10 ccm Natriumzitratblut (ein Teil einer 10%igen Natriumzitratlösung + neun Teile frisches Kälberblut). Die Suspensionsmengen 0,01 ccm und 0,001 ccm werden durch Verdünnung hergestellt:

Zu 0,1 ccm Suspension gibt man 0,9 ccm Aqua dest. und mischt das Ganze kräftig durch, um eine gute Verteilung der Bakterien zu erzielen. Von dieser 1 ccm umfassenden Aufschwemmung wird der zehnte Teil, 0,1 ccm zum Versuch genommen. Der darin enthaltene Bakterienanteil entspricht dann einer Suspension von 0,01 ccm. Durch entsprechende Verarbeitung wurde auch die Suspensionsmenge 0,001 ccm hergestellt.

Blut und Suspension werden gut gemischt und 15 Minuten bei 4.000 Umdrehungen zentrifugiert. Aus den Überständen werden je zwei Ösen Material entnommen, gefärbt nach der Tbc.-Doppelfärbung und mikroskopisch auf das Vorhandensein von bakterien untersucht. Die Sedimente werden dreimal mit Aqua dest. gewaschen unter Einhaltung derselb[illegible] Zentrifugierungszeit und- dauer. Nach den einzelnen Waschungen werden jeweils die Überstände und zum Schluß des Versuches die Sedimente mikroskopisch untersucht.

Nach dem erstmaligen Zentrifugieren sind in dem gefärbten Überstandspräparat vom:

a: Reichlich säurefeste Stäbchen,
b: mäßig viel säurefeste Stäbchen,
c: vereinzelt säurefeste Stäbchen,
d: ganz vereinzelt säurefeste Stäbchen

zu erkennen.

Nach der ersten Waschung mit Aqua dest. sind in den Überständen festzustellen:

a: Reichlich säurefeste Stäbchen, zum Teil in Häufchen gelagert;
b: mäßig viel säurefeste Stäbchen, vereinzelte Häufchenbildung;
c: vereinzelt säurefeste Stäbchen, ganz vereinzelt Häufchen;
d: vereinzelt säurefeste Stäbchen.

Nach der zweiten Waschnung:

a: Reichlich säurefeste Stäbchen, reichlich große und kleine Häufchen;
b: reichlich säurefeste Stäbchen, einzelne große und reichlich kleine Häufchen;
c: mäßig viel säurefeste Stäbchen, ein großes und mäßig viel kleine Häufchen;
d: vereinzelt säurefeste Stäbchen, vereinzelt kleine Häufchen.

Nach der dritten Waschung:

a: Reichlich säurefeste Stäbchen, reichlich große und kleine Häufchen;
b: reichlich säurefeste Stäbchen, vereinzelt große, reichlich kleine Häufchen;
c: mäßig viel säurefeste Stäbchen, vereinzelt große und mäßig viel kleine Häufchen;
d: mäßig viel säurefeste Stäbchen, vereinzelt kleine Häufchen.

Nach Ablauf des Versuches befanden sich in den Präparaten aus 2 Oesen der Sedimente:

a: Massenhaft säurefeste Stäbchen, reichlich große Häufchen;
b: reichlich säurefeste Stäbchen, reichlich große und kleine Häufchen;
c: mäßig viel säurefeste Stäbchen, vereinzelt große und reichlich kleine Häufchen;
d: vereinzelt säurefeste Stäbchen, vereinzelt kleine Häufchen.

Ein unter gleichen Verhältnissen durchgeführter Parallelversuch zeitigte dieselben Ergebnisse.

Man sieht, daß eine große Zahl von Bakterien im Verlaufe des Versuchs verloren gehen. Vor der Behandlung mit Aqua dest. ist in dem Überstand des Blut-Bakterien-Suspensions-Gemisches der Bakteriengehalt verhältnismäßig gering. Die korpuskulären Bestandteile des Blutes, besonders die sich gut absetzenden roten Blutkörperchen, haben beim Zentri-

fugieren die Bakterien mit in das Sediment gerissen. Bei den nachfolgenden Waschungen mit Aqua dest. fällt mit dem zunehmenden Zerfall der Erythrozyten diese Wirkung weg, zumal die entstandenen Blutkörperchenschatten selbst sich nur schwer zentrifugieren lassen. Auf diese Art dürfte das Zurückbleiben relativ größerer Bakterienmengen im Überstand nach erfolgtem Waschen mit Aqua dest. zu erklären sein.

Von der Tatsache des dauernden Bakterienverlustes ausgehend, gelangt man zu der Überlegung, daß bei einer bestimmten Ausgangsbakterienmenge nach den erfolgten Waschungen sich im Sediment keine Bakterien, sondern nur noch Blutbestandteile befinden, daß, mit anderen Worten, sämtliche Bakterien allmählich in Verlust geraten.

Folgende Versuche bestätigen diesen Gedankengang:
Zwei Milliarden Bakterien wiegen ungefähr 1 mg. Es steht eine Suspension zur Verfügung, in der in 1 ccm Aufschwemmungsflüssigkeit 0,0015 g oder 3 Milliarden Bakterien enthalten sind. Ersetzt man 1/3 dieser Suspensionsmenge durch Aqua dest., dann sind in 1 ccm der Aufschwemmung 0,001 g = 2 Milliarden Bakterien vorhanden. Durch weitere Verdünnungen im Verhältnis 1:10 sind Suspensionen herzustellen, die in 1 ccm Flüssigkeit:

0,0001	g	oder	200 Millionen,
0,00001	g	oder	20 Millionen,
0,000001	g	oder	2 Millionen,
0,000 000 1	g	oder	200 000 Bakterien

enthalten usw.

II. Die Zentrifugengläser (a, b, c) werden mit je 10 ccm Natriumzitratblut und je 1 ccm Suspension beschickt. Diese enthält bei:

	a = 0,000 000 1	g	oder	200 000,
bei	b = 0,000 000 0 1	g	oder	20 000,
"	c = 0,000 000 001	g	oder	2 000 Bakterien.

Der Inhalt wird gut durchgeschüttelt und bei 4.000 Umdrehungen 15 Minuten zentrifugiert. Die Überstände werden abgegossen. Die drei Waschungen mit Aqua dest. erfolgen bei genannter Zentrifugierungszeit und - dauer. Dann werden aus den Sedimenten drei Oesen Material entnommen und Präparate hergestellt.

Im Sediment von a (200 000 Bakterien in der Suspension) fanden sich

16 Trompeten-Bazillen,

im Sediment von b (20 000 Bakterien in der Sus - pension)

7 Trompeten-Bazillen

und im Sediment von c (2 000 Bakterien in der Suspension)

keine Trompeten-Bazillen.

Diesen Versuchen folgen noch zwei Parallelversuche, die ebenfalls in den gefärbten Präparaten von c keine Bakterien erkennen lassen. Nur die Bakterienzahl, die sich in den Präparaten von a und b feststellen läßt, unterscheidet sich, wenn auch nur unwesentlich, von der des ersten Versuches. So befinden sich im ersten Parallelversuch in 3 Oesen des

Sedimentes von: a = 14 Bakterien,
von: b = 3 " .

Beim zweiten Parallelversuch in 3 Oesen des Sedimentes von: a = 17 Trompeten-Bazillen,
von: b = 6 Trompeten-Bazillen.
Wenn man also in 10 ccm Natriumzitratblut 2.000 Trompeten-Bazillen vorfindet und behandelt dieses Blut in der angegebenen Weise, so erscheinen am Ende im Sediment keine Bakterien mehr. Der Nachweis von Bazillen ist demnach bei Anwendung der beschriebenen Methode nur möglich, wenn in 1 ccm Blut mehr als 2.000 Bakterien vorhanden sind.

Zusammenfassung.

Bei Aufschwemmungen von Trompeten-Bazillen in Aqua dest. gehen beim Zentrifugieren in 1-und 5%-igen Kochsalzlösungen ungefähr 80% der Bakterien in das Sediment. Die verschiedene Dichte und innere Reibung bei den NaCl-Lösungen ist nicht in der Lage, einen nennenswerten Einfluß auf die Größe der Sedimentation der Trompeten-Bazillen auszuüben.

Die Sedimentierung der Trompeten-Bazillen ist in Serumlösungen bedeutend geringer als in Koch - salzlösungen. Bei der 5%igen Serumlösung gehen nur ungefähr 64% in den Niederschlag, bei der 50%igen noch weniger, 56%. Das bedeutet einen Ausbeute-Unterschied von 13%.

Bemerkenswert ist der Einfluß der Zentrifugierungsdauer auf die Kurve der Sedimentierung der Trompeten-Bazillen in Aqua dest.. Zwischen 5 und 60 Minuten wächst die Menge der niedergeschlagenen Bakterien um 9%. Sie wächst nicht gleichmäßig mit der Erhöhung der Zentrifugierungsdauer. Die größte Steigerung der Ausbeute erfolgt zwischen 30 und 45 Minuten, nämlich um 4,5%. Nach 60minütigem Zentrifugieren ändert sich die Niederschlagsmenge nicht mehr.

Auch beim Zentrifugieren in Serumlösungen liegt die größte Steigerung der Sedimentierung zwischen 30 und 45 Minuten. Sie beträgt 2,4% in dieser Zeitspanne. In Serumlösung gelangen nach 50-minütiger Zentrifugierungsdauer rund 60 % der Gesamtbakterienmenge zur Sedimentation, bei Aqua dest. hingegen rund 96 %.

Im Verlaufe des Versuches zum Nachweis von Trompeten-Bazillen aus dem Blut durch Zentrifugieren geht eine große Bakterienmenge bei der Abgießung der Waschüberstände verloren. Mit dem durch die Waschungen mit Aqua dest. sich einstellendem Zer-

fall der roten Blutkörperchen vergrößert sich auch der Bakterienverlust, da die korpuskulären Blutbestandteile beim Zentrifugieren nun keine größere Menge von Bakterien mehr mit in den Niederschlag reißen können. Der Verlust durch die Überstandsentfernung wirkt sich soweit aus, daß bei einem ursprünglichen Vorhandensein von 0,000 000 01 g oder 2.000 Bakterien in 10 ccm Natriumzitratblut, am Schlusse des Versuches keine Trompeten-Bazillen mehr im Sediment vorhanden sind.

Am Schlusse dieser Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. K ü s t e r für die Überlassung des Themas und die jederzeit freundliche Unterstützung bei Anfertigung der Arbeit meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

L e b e n s l a u f .

Am 23. November 1914 wurde ich als Sohn des Dentisten Fritz Hartling und seiner Ehefrau Luise, geb.Dickhardt, zu Frankfurt a.M. geboren.- Von Ostern 1921 bis Ostern 1924 besuchte ich die Grundschule, die hiesige Merian-Schule.In der Folge geschah der Übergang zur höheren Schule, der Adlerflycht-Schule - Deutsche Oberschule, ebenfalls in Frankfurt a.M., in der ich bis zum Abitur, Ostern 1933, verblieb.- Am 21. April 1933 immatrikulierte ich an der hiesigen Universität. Der Studiengang der Zahnmedizin, den ich mir erwählt hatte,führte über das Physikum, 22. März bis 2. April 1935, zum Staatsexamen, das in der Zeit vom 8.März 1937 bis zum 22. April 1937 absolviert wurde mit dem Prädikat " gut ". Zur augenblicklichen Zeit habe ich eine Assistentenstelle inne.

Friedrich Hartling.